

**INACTIVATION OF PATHOGENS
BY THE PHOTODYNAMIC METHOD**

**ІНАКТИВАЦІЯ ПАТОГЕНІВ
ФОТОДИНАМІЧНИМ МЕТОДОМ**

Svitlana Kalinichenko¹

Natalia Dubinina²

DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-310-1-6>

Abstract. Currently, toxic substances such as formalin and merthiolate are used to inactivate vaccine antigens, which enter into a chemical reaction with the antigen and change its immunogenicity. Thus, in addition to inactivating pathogens, these substances reduce their specific immunogenicity, sometimes up to 100 times, increasing their reactogenicity and allergenicity due to the appearance of abnormal antigenic determinants after a covalent reaction with inactivators. *The purpose* to theoretically justify and experimentally determine the optimal conditions for photodynamic inactivation of viruses on the bacteriophage model, which will provide ways for the development of new classes of non-toxic and non-allergenic virus-containing vaccines. *Methodology* of the determination of conditions, including combinations, irradiation regimes, inactivation rate of candidate viruses and study of their ability to reversion, which will provide the necessary conditions for the creation of new means of non-covalent inactivation and preservation of vaccine preparations. *Results* a technique for obtaining vaccines with increased immunogenicity was proposed, the fundamental regularities of the influence of non-covalent methods of photoinactivation of vaccine antigens of pathogens in the presence of photosensitizers from the group of flavins, phenothiazines and quinones, which are able to be activated under the influence of radiation

¹ Doctor of Medical Sciences (Sc.D.), Senior Research Scientist, Head of the Laboratory State Institution "Institute of Microbiology and Immunology", I.I. Mechnikov National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Ukraine

² Candidate of Medical Sciences (Ph.D.), Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, The National University of Pharmacy, Ukraine

in the UV-visible spectrum, were investigated. *Practical implications.* The obtained results can be used to improve immunoprophylaxis measures, search for new adjuvants, methods of increasing the effectiveness of already developed vaccines and create mucosal vaccines. *Value/originality.* The development of hypoallergenic and non-reactogenic vaccines of the latest class will contribute to the creation of population immunity against many infectious diseases in all strata of the population and significant savings of budget funds.

1. Вступ

Вакцини – медичні імунобіологічні препарати, що призначені для створення специфічного імунітету до інфекційного захворювання. Їх виробляють із ослаблених або інактивованих мікроорганізмів, продуктів їх життєдіяльності або з їх антигенів, у тому числі з антигенів, одержаних генно-інженерним або хімічним шляхом.

При розробці вакцинних препаратів виникають певні проблеми. Так, при застосуванні живих вакцин, незважаючи на генетично закріплену втрату патогенних властивостей вакцинних штамів, за певних умов, вони можуть розмножуватися в місці введення, лімфовузлах і внутрішніх органах. Також необхідно пам'ятати про здатність до реверсії атенуйованих штамів мікроорганізмів, що може стати причиною захворювання (спалах поліомієліту на Закарпатті у 2015 році, який був викликаний циркулюючим вакциноспорідненим вірусом типу 1). Крім того, живі вакцини можуть містити до 95% баластних білків, що підвищує їх реактогенність.

Інактивовані вакцини є менш ефективними, ніж живі, але при повторному введенні створюють досить стійкий імунітет. Для підвищення імуногенності таких вакцин використовують ад'юванти (хімічні чинники), що помітно підвищує їх ефективність. Інактивовані вакцини не потребують строгих умов зберігання і транспортування тому є більш привабливими для фарміндустрії. При виробництві інактивованих вакцин збудників позбавляють вірулентних властивостей шляхом нагрівання, обробки формаліном чи пропіолактоном, ацетоном, спиртом, мертіолятом і ін., таким чином забезпечуючи, з одного боку, надійну інактивацию, а з іншого – мінімальне пошкодження антигенної структури збудника. Але при застосуванні хімічних чинників, особливо при

виробництві анатоксинів, утворюються ковалентні зв'язки між білками токсинів і хімічним чинником, що призводить до утворення нових аномальних антигенних детермінант, які є небажаними, оскільки сприяють збільшенню реактогенності і алергенності таких вакцин.

Субодиничні і спліт-вакцини мають низьку реактогенність, високу ступінь специфічної безпеки і достатню імуногенну активність завдяки використанню ад'ювантів при їх виробництві, які є хімічними чинниками що підвищують реактогенність і алергенність таких вакцин.

Застосування генно-інженерних технологій дозволило створити рекомбінантні вакцини, які є достатньо безпечними та ефективними. Проте, швидка мутація інфекційного чинника в природі призводить до втрати їх ефективності, що ми спостерігаємо на прикладі пандемії коронавірусної інфекції. До того ж рекомбінантні вакцини потребують дуже строгих температурних умов збереження та транспортування.

Виходячи із вищезазначеного, найбільш економічно привабливими є інактивовані вакцини. Саме тому пошук сполук та методів для інактивації патогенів, які б не утворювали з антигеном ковалентних зв'язків, збільшуючи таким чином їх реактогенність та алергенність, вкрай необхідно.

На цей час встановлено, що системи інактивації патогенів (СП) в препаратах крові є ефективними проти численних бактерій, вірусів і паразитів та широко застосовуються в технологіях знезараження продуктів крові в трансфузіології. Ці передумови дали нам ідею про екстраполяцію досвіду трансфузіологів з фотодинамічної інактивації препаратів крові на вакцинологию з метою заміни інактиваторів/консервантів на нетоксичні метаболітні засоби фотоінактивації, від яких не потрібно очищувати вакцину та які не утворюють ковалентних зв'язків з антигенами вакцин.

Перед впровадженням інактиваторів, які не утворюють з антигеном ковалентних зв'язків, необхідно, окрім синтезу найбільш активних речовин, ще й дослідити фундаментальні закономірності фотоінактивації мікроорганізмів-мішеней. Наприклад, вплив часу опромінення на зміни інфекційності патогенів. Без такої інформації, в подальшому для ефективної інактивації продуцентів вакцин неможливо ефективно розрахувати співвідношення інактиватора, інтенсивності опромінення та кількості самого інфекційного чинника. Вказані дослідження дозволять зрозуміти прогнозованість і перспективність заміни ковалентних

інактиваторів на засоби фотодинамічної інактивації бактерій в вакцинології з метою подальшого впровадження при розробці нових класів нетоксичних та неалергенних вакцин.

2. Фотосенсибілізатори та їх роль у фотодинамічній терапії

Антимікробна фотодинамічна терапія (ФДТ) є перспективним підходом щодо фотоінактивації збудників у крові та похідних крові. Повідомлялося, що перевага антимікробної фотодинамічної терапії полягає в тому, що до неї немає стійких штамів. На сьогодні затверджено три фотосенсибілізатори: метиленовий синій (МВ) для плазми та рибофлавін і амтосален для плазми та тромбоцитів [1].

У своєму основному стані молекула фотосенсибілізатора (ФС) є синглетом, оскільки вона має два електрони з протилежними спінами. Поглинання фотона світла ($h\nu$) з відповідною квантовою енергією (з відповідною довжиною хвилі) призводить до збудження одного електрона на більш енергійну орбіталь. Цей синглетний PS в збудженому стані нестійкий і втрачає надлишок енергії або як випромінювання світла (флуоресценція), або як тепло (внутрішнє перетворення). Збуджений синглет ФС може зазнати процесу, відомого як «міжсистемний перетин», щоб утворити більш стабільний збуджений триплетний стан з паралельними спінами. Молекула ФС триплетного стану може розпадатися назад до основного стану (випромінюючи фосфоресцентний фотон), але це «заборонений процес» за правилами квантового відбору, тому триплетний стан набагато стабільніший, ніж синглетний стан, який має тривалість життя мікросекунди порівняно з лише наносекундами для збудженого синглета. Це довге життя триплетного стану дозволяє йому достатньо часу передати свою енергію, зіткнувшись з молекулярним киснем (O_2), який унікальний тим, що є молекулярним триплетом у основному стані. Цей етап передачі енергії призводить до утворення синглетного кисню (1O_2) (і основного ФС), і реакція називається фотохімічним процесом типу II. Також може відбуватися фотохімічний процес типу I, в результаті якого PS у збудженому стані піддається реакції переносу електронів, що з часом утворює активні форми кисню (АФК). Цей механізм може включати або отримання, або донорство електрона з утворенням радикального катіона або радикального аніона. Радикальний аніон може реагувати з киснем,

утворюючи супероксидний радикальний аніон ($O_2 \cdot^-$). Дисмутація або одноелектронне відновлення $O_2 \cdot^-$ – дає пероксид водню (H_2O_2), який, у свою чергу, може зазнати іншого одноелектронного відновлення, утворюючи потужний окислювач – гідроксильні радикали ($HO \cdot$). Генерація АФК за допомогою механізму типу II набагато простіша, ніж за допомогою типу I, і вважається, що більшість ФС, які використовуються, наприклад, у протираковій фотодинамічній терапії, працюють за допомогою типу II, а не механізму типу I (рис. 1) [2; 3].

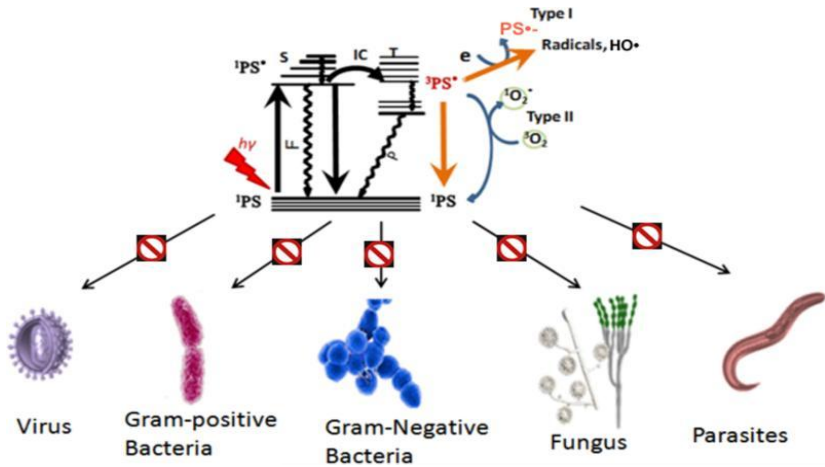


Рис. 1. Діаграма Яблонського, що показує фотохімічні шляхи в ФДТ

Примітка. Основний стан 1PS (фотосенсибілізатор) поглинає фотон, утворюючи збуджений синглетний стан $^1PS^*$, який може зазнати міжсистемного схрещування (МС), утворюючи триплетний стан $^3PS^*$. Цей довгожителі може переносити енергію (тип II) з утворенням із молекулярного кисню 3O_2 синглетного кисню $^1O_2^*$ або перенесення електронів (тип I) з утворенням гідроксильних радикалів $HO \cdot$. Обидва ці АФК здатні вбивати широкий спектр патогенів.

Флавіни є речовинами, здатними до фотомодифікації, тобто здатні переносити заряд при поглинанні фотонів, що опосередковує клітинні сигнали або експресію генів в ендогенних білкових комплексах, таких як домени, що сприймають систему світло-кисень-напруга у бактерій і рослин [4]. У той же час, біологічно нерегульований фотонно-збуджений стан флавінів в ультрафіолетово-синій (УФ-синій) спектральній

смузі може призвести до утворення або синглетного кисню ($^1\text{O}_2$) через перенесення енергії до кисню навколишнього середовища (тип II), або водню пероксиду та похідних за допомогою радикалізації (тип I) (АФК).

Антибіотикогенна властивість рибофлавіну відома давно і використовується для противірусної та антибактеріальної дезінфекції; для зміцнення тканини рогівки при фоторефракційній хірургії за допомогою ROS-індукованого зшивання колагену [5; 6].

Рибофлавін завдяки наявності різних мезоатомів має чудові фотофізичні та фотохімічні властивості. Кілька досліджень показують, що фотоактивований рибофлавін виробляє АФК [7; 8]. Рибофлавін поглинає фотони після опромінення світлом і зазнає міжсистемного перетворення, тобто із синглетного стану в триплетний. Цей триплетний стан реагує з молекулярним киснем, утворюючи тим самим АФК. Згенерований АФК атакує клітинні макромолекули і руйнує цілісність мембрани, тим самим вбиваючи мікроорганізм.

Дослідження Khan S. та співавторів продемонстрували антимікробний фотодинамічний потенціал рибофлавіну, опроміненого білим світлом протягом 2 год, за допомогою дослідної моделі з кишковою паличкою. Оброблені бактеріальні клітини демонстрували рясне внутрішньоклітинне утворення АФК і помітне збільшення рівня маркерів окисного стресу – перекисного окислення ліпідів (рівня малонового діальдегіду, МДА) та окислювальних модифікацій білків (рівня карбонілювання амінокислот білків, PCA), а також значне зниження активності лактатдегідрогенази (ЛДГ). Також спостерігалось помітне зменшення колонієутворюючих одиниць *E. coli*, що було підтверджено додатково оптичними мікроскопічними та SEM-зображеннями шляхом реєстрації загибелі бактерій. Таким чином, це дослідження показує, що фотоосвітлений рибофлавін перетворює окислювально-відновний статус бактеріальних клітин у скомпрометований стан, який призводить до значного пошкодження мембрани, що в кінцевому підсумку спричиняє загибель бактерій. Активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази істотно знижена у зразках, які піддаються фотоосвітленому рибофлавіну, порівняно із зразками, які піддаються впливу рибофлавіну без світла та впливу лише світла. Зниження рівня клітинного антиоксидантного метаболіту – глутатіону (GSH) значно зменшилось у зразках, що зазнали дії фотоосвітленого рибофлавіну. Спе-

цифична активність глутатіон-S-трансферази (GST) – GSH (який бере участь у процесі детоксикації), суттєво зросла в клітинах, що зазнали дії збудженого світлом рибофлавіну. Це дослідження показує ще один аспект до використання фотоактивованого рибофлавіну, демонструючи, що клінічно важливі мультирезистентні бактерії чутливі до АФК, що генерується фотоактиваним рибофлавіном [9].

Дослідження Maisch T. та співавторів [10] показує, що синтезовані похідні флавіну можуть бути використані як фотосенсибілізатори для місцевого застосування для деколонізації бактеріями шкіри та слизової. Синтезовані похідні флавіну показали високий квантовий вихід синглетного кисню приблизно 75%. Високорезистентні бактерії, такі як MRSA (стійкий до метициліну золотистий стафілокок), ЕНЕС (ентерогеморагічна кишкова паличка), синьогнійна паличка та *Acinetobacter baumannii*, інкубували з похідними флавіну *in vitro* і згодом опромінювали видимим світлом лише протягом декількох секунд. Після опромінення кількість життєздатних бактерій зменшилась до $6 \log_{10}$ залежно від концентрації похідних флавіну та світлового дозування. Бактерицидна дія фотоактивованого рибофлавіну не залежала від типу бактерій та відповідної картини стійкості до антибіотиків. На відміну від цього, концентрація фотосенсибілізатора та параметри світла, що використовуються для знищення бактерій, не впливали на життєздатність клітин кератиноцитів людини (терапевтичне вікно). Таким чином, дослідження показує, що мультирезистентні бактерії можна безпечно та ефективно знищити комбінацією модифікованих молекул вітаміну B₂, кисню та видимого світла, тоді як нормальні клітини шкіри виживають [10].

Thakurі P. та співавтори показали в своєму дослідженні, що коли рибофлавін збуджувався синім світлом, він був здатний вбивати *S. aureus* та *P. aeruginosa* [11]. У дослідженні O'Rourke J. було показано аналогічний ефект фотоактивованого рибофлавіну на *Bacillus subtilis* [12].

У дослідженні Makdoui K. та співавторів рибофлавін посилював антибактеріальну дію на дослідний штам MRSA для двох різних довжин хвиль синього світла – 412 та 450 нм. Використовуючи вищу дозу, зменшення КУО становило 99% та 98% відповідно для світла 412 та 450 нм. Бактерицидна ефективність була високою також у глибокому шарі рідини (93%, вища доза). Ці результати свідчать про те, що синє

світло можна розглянути для можливого впровадження при глибоких інфекціях рогівки [13].

Також було показано, що рибофлавін / УФА та попередня обробка амфотерицином В були ефективними проти таких грибкових збудників, як *C. albicans*, *Fusarium* sp. та *A. fumigatus*, які можуть спричинити інфекційний кератомікоз [14].

Але під час дослідження Tuncann G. та співавторів, де формування біоплівки та антибіоплівкову активність оцінювали за допомогою різних фотосенсибілізаторів та типів опромінення, було помічено, що обробка рибофлавіном та УФ продемонструвала лише мінімальний вплив на *Staphylococcus aureus* ATCC 35556, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Candida albicans* ATCC 90028 та *Candida parapsilosis* ATCC 96142 порівняно із зеленим світлодіодом та барвником бенгальським червоним. Найнижче пригнічення біоплівки (показники інгібування біоплівки) було виміряно у групі, яка отримувала лікування рибофлавіном + УФ порівняно зі світлодіодами та бенгальським червоним та червоними світлодіодами з метиленовим синім. Групи, до яких застосовували рибофлавін + УФ, не виявляли впливу на формування біоплівки при *C. parapsilosis* і лише мінімально зменшували утворення біоплівки у *S. aureus* та *S. epidermidis* та на 24,5% у *C. albicans* [15].

Рибофлавін як фотосенсибілізатор при інактивуванні вірусів

Вітамін В₂, активований УФО або видимим світлом, також застосовується як засіб, що зв'язує нуклеїнові кислоти, для використання для фотоінактивації таких патогенів, як віруси, що містять нуклеїнові кислоти та знаходяться в плазмі, тромбоцитах та еритроцитах. Кілька досліджень виявили ефективність зменшення зараженості біоматеріалу деякими вірусами, включаючи вірус імунодефіциту людини 1 (ВІЛ-1), вірус вірусної діареї великої рогатої худоби (BVDV), вірус гепатиту В (HBV), вірус псевдосказу [16; 17].

Було показано, що рибофлавін після опромінення ультрафіолетовим світлом істотно впливає на зменшення інфекційності вірусу Денге, випадки зараження яким виникають у всьому світі, що становлять ризик для безпеки переливання крові. Після обробки (спостерігалось зменшення 1,81 log) для DENV-4, після чого спостерігалось (зменшення на 1,71 log) для DENV-3, (зменшення 1,45 log) для DENV-2, а потім (зменшення на 1,81 log) DENV-1. Це дослідження

дійшло висновку, що рибофлавін та УФ-світло можуть бути альтернативним підходом для управління ризиком передачі DENV через трансфузію завдяки здатності інактивувати DENV 1-4 у концентратах тромбоцитів [18].

Щодо ризику трансфузійної трансмісії, дослідження Keil S.D. та інших показало, що рибофлавін та ультрафіолетове світло ефективно знижують титр коронавірусу респіраторного синдрому Близького Сходу (MERS-CoV) у продуктах плазми людини до межі виявлення, припускаючи що процес лікування може зменшити ризик трансфузійної передачі MERS-CoV [19].

Ще одне дослідження стосується технології знищення вірусів, що використовується для знезараження крові та плазми. У цьому дослідженні була отримана плазма від відновлених пацієнтів після зараження Ебола вірусом (EBOV), яка називається «реконвалесцентною плазмою», і є ефективним засобом лікування хворих доступним в ендемічних районах. Тоді як цей тип плазми несе ризик інтродукції інших патогенів, в тому числі для інших штамів EBOV він знижує рівень життєздатних патогенів, при цьому не змінює рівень захисних антитіл та цільної крові людини ($\geq 3,0$ -log зменшення) та без зменшення титрів захисних антитіл у плазмі людини, Таким чином, показано тестування *in vivo*, для визначення можливості покращення безпеки продуктів реконвалесцентної крові під впливом UV + RB [20; 21].

Рибофлавін як частина технології фотосенсибілізації для зниження навантаження патогенами

Таким чином, система «рибофлавін + UVB» знайшла своє застосування в технології зменшення навантаження патогенами – система «Mirasol»[®] Технологія зменшення збудника (PRT) («Terumo BCT Inc.», Лейквуд, США), яка використовується для стерилізації крові та плазми для переливання [22].

Отримано велику кількість доказів антимікробної активності «рибофлавін + УФВ», фокус уваги перейшов до безпеки його застосування та деяких можливих змін, які можуть відбутися в тромбоцитах та плазмі.

Дослідження Abonnenc M. та інших виявило, що оброблені Mirasol[®] тромбоцити проявляють здатність до більшого терміну зберігання у порівнянні з контролем (збільшення маркерів активації та

швидкості гліколізу, нижчий гіпотонічний шок та реакції активації подвійних агоністів та зниження загальної антиоксидантної здатності). Автори також підтвердили, що лише УФ-випромінювання викликає ураження тромбоцитів. Рибофлавін же виконує внутрішньоклітинну захисну роль, тоді як позаклітинний антиоксидантний захист патогенів він зменшує. У цьому дослідженні були виявлені деякі переваги розчинів добавок при зберіганні тромбоцитів, що містять калій і магній, які підтвердили зменшення ступеня руйнування еритроцитів протягом зберігання [23].

У новому дослідженні Hermida-Nogueira та співавторів було виявлено велику кількість білків, пов'язаних з активацією тромбоцитів та ураженням тромбоцитів, які можуть відігравати роль у можливих побічних реакціях трансфузії. У цьому дослідженні було виявлено, що на 7-й день зберігання після обробки «Мірасолом»® спостерігалася дерегуляція експресії більш ніж 151 білка. Ця група білків включає С-С мотив хемокінового ліганду 5 (CCL5) та тромбоцитарний фактор 4, хемокіни зі здатністю залучати нейтрофіли та моноцити, що може спричинити побічні реакції при переливанні. Крім того, виявлено, що інші глікопротеїни та маркери активації тромбоцитів були підвищеними на 7-й день. Білки, пов'язані з гліколізом та виробленням лактату, виявилися значно зміненими, що демонструє дерегуляцію метаболізму тромбоцитів на 7-й день. Отримані результати дають нову інформацію про можливі впливи EV тромбоцитів на побічні реакції при переливанні.

Рибофлавін як засіб фотодинамічної терапії раку

Вважалося, що рибофлавін є перспективним протипухлинним засобом у фотодинамічній терапії, хоча подальше застосування методу було обмежене незрозумілим молекулярним механізмом. Одна із статей показує, що рибофлавін здатний розпізнавати невідповідність G-T і ефективно опромінювати одноланцюгові розриви в дуплексних ДНК-мішенях. У присутності рибофлавіну фотоопромінення може спричинити загибель пухлинних клітин, дефектних у системі відновлення невідповідностей, вибірково, виділяючи невідповідність G-T як потенційну мішень в ракових клітинах. Більше того, рибофлавін є перспективною сполукою для подальшого проектування лікарських засобів завдяки властивому йому специфічному визнанню невідповідності G – T [24].

Кілька досліджень показали, що ФДТ-опосередкована цитотоксичність виникає трьома шляхами: апоптотична, некротична та пов'язана з аутофагією загибель клітин. Деякі висновки показують, що методи ФДТ, які діють шляхом індукування апоптотичної загибелі клітин, приводять до виділення високоімуногенних продуктів та відповідно можуть стимулювати протипухлинний імунітет [25].

У дослідженні Акасова Р. та співавторів водорозчинна форма рибофлавіну – флавіновий мононуклеотид (ФМН) – була показана як перспективний засіб для фотодинамічної терапії меланоми. Опромінення синім світлом з дозою 5 Дж/см² клітин меланоми, які попередньо пройшли інкубацію з ФМН, призвело до загибелі клітин через апоптоз. Таким чином, значення IC50 клітин меланоми A375 людини, Mel II та Mel Z були в діапазоні концентрацій ФМН 10 – 30 мкМ, що може бути досягнуто в тканині пухлини при системному введенні. Регресія ксенотрансплантата меланоми у мишей спостерігалася в результаті внутрішньовенного введення ФМН з подальшим опроміненням синім світлом ділянки пухлини. Інгібування росту пухлини становило 85-90% протягом 50 днів після лікування ФДТ [26].

Зшивання колагену рогівки з рибофлавіном як фотодинамічна терапія при лікуванні інфекційного кератиту

Інфекційний кератит – захворювання рогівки ока, яке потенційно здатне призводити до сліпоти. Окрім антимікробних препаратів, використання зшивального колагену рогівки (CXL) шляхом фотодинамічної терапії (ФДТ) також розглядається як потенційна альтернатива при лікуванні інфекційного кератиту [27; 28]. Таким чином, CXL також був описаний як рибофлавін-UVA-фотодинамічна інактивація (рибофлавін-UVA-PDI) [29].

Скаат А. та співавтори представили дані, коли додаткове застосування фотохімічної терапії рибофлавіном / UVA позитивно впливає на рефрактерний інфекційний кератит. Був проведений ретроспективний аналіз інтервенційної серії випадків, коли 6 очей 6 пацієнтів з важким інфекційним кератитом, які всі збагачували звичайну терапію багатьма препаратами, отримували лікування рибофлавіном / UVA. В результаті п'ять із 6 пацієнтів продемонстрували швидке зменшення симптомів та зменшення розміру інфільтрату після фотохімічної терапії рибофлавіном / UVA. Ознаки інфекції та запалення здебільшого проходять

протягом 1-2 тижнів після лікування. Незважаючи на таку терапію, у одного пацієнта стан продовжував погіршуватися, і була проведена кератопластика. Зазначено, що лікування ФДТ є безпечним та ефективним, і його слід розглядати як частину терапії першої лінії у важких випадках інфекційного кератиту [30].

Дослідження Song X. та інших виявило вплив зшивання (CXL) на життєздатність, апоптоз, проліферацію, активацію та секрецію цитокінів (FGFb, HGF, TGF β 1, VEGF, KGF, IL-1 β , IL-6 та IL-8) кератоцитів кератоконуса (КС) людини *in vitro*. Кератоцити піддавались UVA-освітленню (370 нм, 2 Дж/см²) під час впливу 0,1% рибофлавіну та 20% декстрану. Результати показують, що через 24 години після поперечного зв'язування CXL знижується життєздатність, запускається апоптоз та інгібується проліферація, без впливу на мультипотентну трансформацію гемопоетичних стовбурових клітин та міофібробластичну трансформацію кератоцитів КС. CXL запускає секрецію FGFb кератоцитів КС тимчасово (5 годин), нормалізуючись через 24 години [31].

Імунологічні аспекти створення вакцин на основі фотоінактивованих патогенів

Зазвичай вакцинальний імунітет прийнято оцінювати за гуморальною, специфічною відповіддю, а саме – рівнем захисних імуноглобулінів до інфекційного агента. Але формування адаптивного імунітету, специфічної імунної відповіді цілком обумовлено і залежить від адекватної реакції природного імунітету. Природний імунітет – давній захист організму від інфекційних агентів, першим реагує і здатний створювати пришвидшену неспецифічну відповідь на мікробний агент. Розпізнавання патогенів клітинами-ефекторами природженого імунітету відбувається за допомогою образ-розпізнавальних рецепторів (pattern-recognition receptors – PRRs), які взаємодіють з консервативними структурами мікроорганізмів (ЛПС, пептидогліканами, ліпoteйхоєвою кислотою, ssРНК та dsРНК та ін.), так званими патоген-асоційованими молекулярними структурами (PAMPs) [32; 33].

Серед PRRs найбільшу увагу привертають Toll-подібні рецептори (TLRs), що експресуються ефекторними клітинами природженого імунітету. Після зв'язування з лігандами TLRs взаємодіють з клітинними адаптерними молекулами і починають передачу сигналу Т-лімфоцитам. Найважливішою частиною механізму дії бактеріальних лігандів,

маркером відповіді на антиген є посилення проліферації і функціональної активності клітин-ефекторів. Ключовими елементами ефекторних механізмів виступають дендритні клітини (DC) і натуральні кілери (NK). DC забезпечують розпізнавання, процесинг патогенів та антигенне представлення їх у складі молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) Т-лімфоцитам. Для здійснення цих функцій DC продукують цитокіни, ко-стимуляторні адгезивні молекули, молекули антиген представлення. Під час виконання своїх функцій DC забезпечують взаємозв'язок природженого і придбаного імунітету і програмують диференціювання Т-лімфоцитів за Th1- або Th2-типом [34; 35].

Таким чином, перед впровадженням інактиваторів, які не утворюють з антигеном ковалентних зв'язків, необхідно, окрім синтезу найбільш активних речовин, ще дослідити фундаментальні закономірності фотоінактивації мікроорганізмів-мішеней. Наприклад, вплив часу опромінення на зміни інфекційності патогенів. Без такої інформації, в подальшому для ефективної інактивації продуцентів вакцин неможливо ефективно розрахувати співвідношення інактиватора, інтенсивності опромінення та кількості самого інфекційного чинника. Окрім того, невідомими є метаболіти після руйнування самого інактиватора. Вказані дослідження дозволять зрозуміти прогнозованість і перспективність заміни ковалентних інактиваторів на засоби фотодинамічної інактивації бактерій в вакцинології з метою подальшого впровадження при розробці нових класів нетоксичних та неалергенних вакцин.

3. Пошук та відбір тест-штамів для дослідження

Для експериментальних досліджень відбір типових за морфологічними, тинкторіальними і біохімічними ознаками клінічних ізолятів *Escherichia col*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* проводили за їх фагочутливістю до специфічних бактеріофагів. Визначення чутливості бактерій щодо специфічного бактеріофагу проводили крапельним методом [36]. Визначення титру фагу проводили за допомогою spot-тесту [37]. При статистичному аналізі результатів використовували параметричні методи [38].

Як контролю було використано референс-штами бактерій (*S. aureus* ATCC 25923 (F-49), *E. coli* ATCC 25922 (F-50) та *P. aeruginosa* ATCC

27853 (F-51), одержані з Філії Національного музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН».

У типових за морфологічними, тинкторіальними і біохімічними ознаками клінічних ізолятів *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* визначали чутливість до комерційного імунобіологічного засобу Піофаг® (реєстраційне посвідчення UA/15974/01/01). Всі дослідження виконані в трьохкратній повторності у різні дні.

Таблиця 1

**Лізуюча активність Піофаг®
відносно клінічних ізолятів бактерій**

Штами	CL (абс./%)	SCL (абс./%)	+++ (абс./%)	++ (абс./%)	+ (абс./%)	(абс./%)	Всього штамів
<i>E. coli</i>	18 / 27,7%	13 / 20,0%	11 / 16,9%	12 / 18,4%	8 / 12,3%	3 / 4,7%	65
<i>P. aeruginosa</i>	4 / 7,8%	5 / 9,8%	6 / 11,8%	9 / 17,6%	11 / 21,6%	16 / 31,4%	51
<i>S. aureus</i>	24 / 31,2%	16 / 20,8%	15 / 19,5%	5 / 6,5%	8 / 10,4%	9 / 11,6%	77

Примітка: CL – зливний лізис; SCL – напівзливний лізис; +++ – окремі негативні колонії (більше 20); ++ – окремі негативні колонії (від 10 до 20); + – окремі негативні колонії (до 10); – – відсутність лізису

Як видно з таблиці 1, негативну чутливість мали 4,7% клінічних ізолятів *E. coli*, 31,4% ізолятів *P. aeruginosa* та 11,6% ізолятів *S. aureus*. Слабку та помірну чутливість проявляло 47,6% ізолятів *E. coli*, 51% ізолятів *P. aeruginosa* та 36,4% ізолятів *S. aureus*. Високочутливими до Піофаг® було 47,7% клінічних ізолятів *E. coli*, 17,6% ізолятів *P. aeruginosa* та 52% ізолятів *S. aureus*.

У подальші дослідження взято культури бактерій *E. coli*, *P. aeruginosa* та *S. aureus* що мали ступінь лізису CL або SCL:

**4. Експериментальне визначення
інфекційної активності Піофаг®**

Титрування (визначення інфекційної активності) комерційного бактеріофагу (Піофаг®) проводилось двома методами: спочатку за Апельманом (визначення найбільшого розведення фага, яке пригнічує ріст тест-культур), а потім за Грація (визначення БУО в 1 мл).

Експериментально встановлено, що інфекційна активність (титр фага) Піофаг® за методом Аппельмана становить 10^{-9} (табл. 2).

Таблиця 2

Інфекційна активність Піофаг® за методом Аппельмана

Тест-штам	Розведення синьогнійного бактеріофага									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-

Примітка: «+» – наявність повного лізису; «±» – наявність часткового лізису; «-» – відсутність лізису

Визначення бляшко утворюючих одиниць (БУО) в 1 мл Піофаг® за методом Грація проводили із розведення 10^{-8} , яке давало повний лізис тест-культури при визначенні титру за методом Аппельмана (табл. 3).

Таблиця 3

Інфекційна активність Піофаг® за методом Грація

Тест-штам	БУО	Активність бактеріофага відносно тест-культури, $M \pm \sigma$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	3,66±0,57
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	5,66±0,57
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	1,66±0,57
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	

Експериментально визначено, що середня активність Піофаг® до *P. aeruginosa* ATCC 27853 становила $(3,66 \pm 0,57) \times 10^9$ БУО/мл, *E. coli* ATCC 25922 – $(5,66 \pm 0,57) \times 10^9$ БУО/мл, а *S. aureus* ATCC 25923 $(1,66 \pm 0,57) \times 10^9$ БУО/мл.

Встановлено, що у клінічних штамів, до яких Піофаг® проявляв більш високу літичну активність (CL – зливний лізис) у попередньому досліді, також були вищими і показники БУО, що, з нашої точки зору, обумовлено різною чутливістю штамів до культури специфічних бактеріофагів.

5. Методологія інактивації патогенів фотодинамічним методом

З основного розчину фотоінактиватора (1% рибофлавін) робили наступні розведення у ізотонічному розчині: 0,5%; 0,2%; 0,1%; 0,01%; 0,02% та 0,05%.

Режими опромінення були наступними: 60 хв; 45 хв; 30 хв; 15 хв.

У лунки стрипованих полістиролових стерильних планшетів, у трьох повторях, вносили по 0,1 мл розчину рибофлавіну із різною концентрацією та додавали по 0,1 мл Піофаг®, ретельно перемішували та опромінювали УФО у зазначених вище режимах.

Після чого робили висіви Піофаг® (по 10 мкл) із зразків на відповідні тест-культури за методом spot-тесту, інкубували протягом 18-20 год при 28-29 °С та проводили облік результатів (рис. 2).

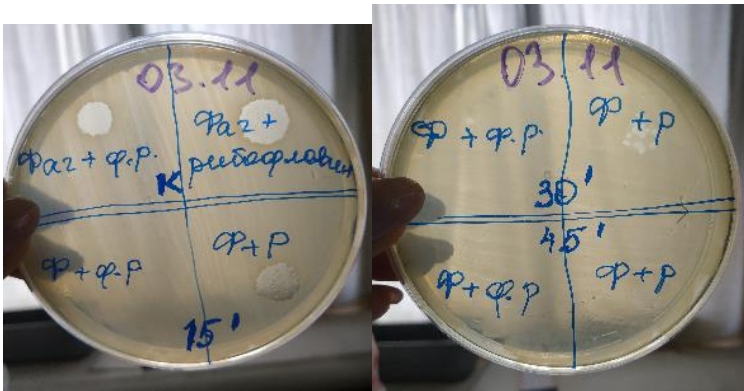


Рис. 2. Лізуюча активність Піофаг® залежно від часу впливу УФО

Отримані результати досліджень, свідчать, що час опромінення УФ 60 хв призводить до віруліцидної дії у всіх дослідах, незалежно від застосування ФС. Розчини рибофлавіну у концентраціях від 0,5% до 0,05%

призводили до часткового захисту Піофаг® від дії УФО – після 45-хвилинного опромінення фіксувались окремі негативні колонії на відміну від контролю. Інактивація Піофаг® на рівні контролів була визначена за впливу двох концентрацій фотоінактиватора – 0,02% і 0,01%.

За результатами експерименту було прийнято рішення використувати у подальших дослідях 0,02% і 0,01% розчини рибофлавіну при режимі УФО 15 хвилин. Також було прийнято рішення після внесення до розчинів Піофаг®, витримувати суміш 15 хв при кімнатній температурі, після чого піддавати дії УФО протягом 15 хв. Але досягнути бажаного ефекту таким чином не вдалося.

Тому була проведена модифікація ФС шляхом додавання до 0,02% розчину рибофлавіну розчину циклодекстрину до кінцевої концентрації 0,5% (розчин ФС № 1) та до 0,01% розчину рибофлавіну – розчин вікасолу (синтетичний аналог вітаміну К) та розчин вітаміну В6 (пиридоксину гідрохлориду) до кінцевої концентрації 0,01% кожного інгредієнту (розчин ФС № 2). Як розчинник використовували стерильний фізіологічний розчин.

За результатами визначення кількості БУО Піофаг® встановлено достовірне зниження їх кількості при застосуванні обох модифікованих розчинів ФС (табл. 4).

Таблиця 4

Протифагова дія ФДТ

Умови досліді	Кількість БУО Піофаг®	Статистично достовірні зміни кількості БУО по відношенню до контролю Піофаг®
0,02% розчин рибофлавіну	9,28±0,36	відсутні
15 хв УФО	8,89±0,45	відсутні
0,02% розчин рибофлавіну + 15 хв УФО	8,98±0,27	відсутні
Розчин ФС № 1	9,08±0,4	відсутні
Розчин ФС № 1 + 15 хв УФО	6,4±0,76	зниження на 99,9%
Розчин ФС № 2	9,22±0,66	відсутні
Розчин ФС № 2 + 15 хв УФО	3,2±0,51	зниження на 99,9999%
Контроль Піофаг®	9,16±0,57	-
Контроль тест-штамів	0	-

Визначення робочої активності Піофаг® після застосування вищезначених умов реверсійним методом показало збіжність результатів – найбільшу протифагову активність проявляв ФС 2 при однакових умовах опромінення.

Визначення робочої активності Піофаг® після застосування вищезначених умов реверсійним методом показало збіжність результатів – найбільшу протифагову активність проявляв ФС 2 при однакових умовах опромінення (рис. 3).

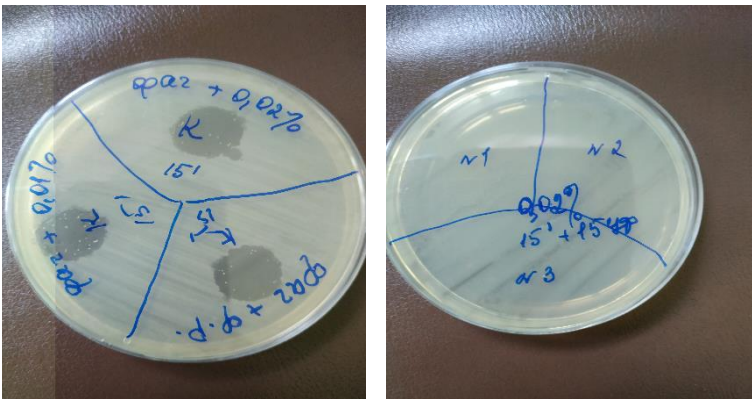


Рис. 3. Лізуюча активність Піофаг® залежно від концентрації фотоінактиватору

6. Режими фотодинамічної інактивації Піофаг® в макроумовах

Попередні дослідження проводились у мікропланшетах, тому для наближення умов фотодинамічної інактивації бактеріофагів до виробничих, наступні досліди проведено у об'ємах 100 мл. Для цього використовувались стерильні одноразові ПВХ-пакети для крові (рис. 4).

Для охоплення всієї площі пакету УФ опроміненням використовували 2 опромінювача з озоновою бактерицидною лампою ОВВ 15Р-МЕТАЛ, потужність УФ-С опромінення 3,1 Вт; частота 50 Гц; довжина бактерицидної хвилі 253,7 нм.

За результатами визначення кількості БУО Піофаг® встановлено достовірне зниження їх кількості при застосуванні ФДТ (табл. 5).



Рис. 4. ФС рибофлавін у стерильному одноразовому ПВХ-пакеті для крові

Таблиця 5

Протифагова дія ФДТ Піофаг® у макрооб'ємах

Умови досліджу	Кількість БУО Піофаг®	Статистично достовірні зміни кількості БУО по відношенню до контролю фагу
0,02 % розчин рибофлавіну	9,08±0,49	відсутні
15 хв УФО	7,15±0,67	відсутні
0,02 % розчин рибофлавіну + 15 хв УФО	5,63±0,81	зниження на 99,99 %
Контроль фагу	8,96±0,2	-
Контроль тест-штамів	0	-

Подовження часу опромінення до 45 хв призводило до 100% віруліцидного ефекту.

7. Висновки

1. За даними інформаційно-аналітичного дослідження системи інактивації патогенів за допомогою фотодинамічного впливу є перспективним та альтернативним методом заміни традиційних способів, що використовуються у технологіях одержання імунобіологічних препаратів.

2. Встановлено ефективність фотосенсибілізатору рибофлавіну у технології фотодинамічної інактивації Піофаг® як моделі вірусів.

3. Визначено оптимальну концентрацію фотосенсибілізатора рибофлавіну – 0,01-0,02%; час опромінення – від 30 хвилин опромінювача з озоною бактерицидною лампою ОБВ 15Р-МЕТАЛ, потужність УФ-С опромінення 3,1 Вт; частота 50 Гц; довжина бактерицидної хвилі 253,7 нм.

4. Преекспозиція фотосенсибілізатору з Піофаг® від 15 до 30 хв до початку опромінення призводить до підвищення ефективності фотодинамічної інактивації фагів.

5. Модифікація ФС шляхом додавання до 0,02% розчину рибофлавіну розчину циклодекстрину до кінцевої концентрації 0,5% (розчин ФС № 1) та до 0,01% розчину рибофлавіну – розчин вікасолу (синтетичний аналог вітаміну К) та розчин вітаміну В6 (пиридоксину гідрохлориду) до кінцевої концентрації 0,01% кожного інгредієнту (розчин ФС № 2) призвела до підсилення інактивації Піофаг® на 99,9% при застосуванні ФС 1 та на 99,9999% – при застосуванні ФС 2 у порівнянні з контролем (нативний рибофлавін).

6. Достовірні показники інактивації фагів макрометодом реєструються за 15 хвилин впливу ФДТ, а повне знезараження розчину – через 45 хвилин опромінення.

7. Проведені дослідження дозволяють зрозуміти прогнозованість і перспективність заміни ковалентних інактиваторів на засоби фотодинамічної інактивації патогенів в вакцинології з метою подальшого впровадження при розробці нових класів нетоксичних та неалергенних вакцин.

Список літератури:

1. Sousa V., Gomes A.T.P.C., Freitas A., et al. Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* in Blood Plasma and Whole Blood. *Antibiotics (Basel)*. 2019. 8(4). 221. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040221>

2. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016. 473(4). 347–364. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>

3. Hamblin M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016. 33. 67–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>

4. Conrad K.S., Bilwes A.M., Crane B.R. Light-Induced Subunit Dissociation by a Light-Oxygen-Voltage Domain Photoreceptor from *Rhodobacter*. *Biochemistry*. 2013. 52(2). 378–391.

5. Ruane P.H., Edrich R., Gampp D., et al. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 2004. 44(6). 877–885. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03355.x>
6. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*. 2003. 135. 620–627. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(02\)02220-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(02)02220-1)
7. Sheraz M.A., Kazi S.H., Ahmed S., et al. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J. Org. Chem.* 2014. 10. 1999–2012.
8. Khan S., Naseem I. Photocatalytic interaction of aminophylline-riboflavin leads to ROS-mediated DNA damage and cell death: a novel phototherapeutic mechanism for cancer. *IUBMB Life*. 2017. 69. 611–622.
9. Khan S., Rayis M., Rizvi A., et al. ROS mediated antibacterial activity of photoilluminated riboflavin: a photodynamic mechanism against nosocomial infections. *Toxicology reports*. 2019. 6. 136–142.
10. Maisch T., Eichner A., Späth A. et al. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PLoS One*. 2014. 9(12). e111792.
11. Thakuri P.S., Joshi R., Basnet S., et al. Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Nepal Med. Coll. J.* 2011. 13(4). 281–284.
12. O'Rourke J.F., Dowds B.C. Dye-mediated photodynamic inactivation of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Soc. Trans.* 1992. 20(1). 76S.
13. Makdoui K., Goodrich R., Bäckman A. Photochemical eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by blue light activation of riboflavin. *Acta Ophthalmol.* 2017. 95(5). 498–502.
14. Sauer A., Letscher-Bru V., Speeg-Schatz C. In vitro efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010. 51.8.t.3950-3953.
15. Tunccan Ö.G., Kalkanci A., Unal E.A. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turk. J. Med. Sci.* 2018. 48(4). 873–879.
16. Schuyler R. Use of riboflavin for photoinactivation of pathogens in blood components. *Transfus. Apher. Sci.* 2001. 25. 189–190.
17. Zhu L., Tong H., Wang S. Effectiveness of a flow-based device using riboflavin photochemistry in damaging blood-borne viral nucleic acids. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2018. 183. 391–396.
18. Faddy H.M., Fryk J.J., Watterson D. Riboflavin and ultraviolet light: impact on dengue virus infectivity. *Vox Sang.* 2016. 111(3). 235–241.
19. Keil S.D., Bowen R., Marschner S. Inactivation of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in plasma products using a riboflavin-based and ultraviolet light-based photochemical treatment. *Transfusion*. 2016. 56(12). 2948–2952.
20. Cap A.P., Pidcoke H.F., Keil S.D. et al. Treatment of blood with a pathogen reduction technology using ultraviolet light and riboflavin inactivates Ebola virus in vitro. *Transfusion*. 2016. 56(1). 6–15.

21. Hermida-Nogueira L., Barrachina M.N., Izquierdo I., et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion. *J. Proteomics*. 2020. 210. 103529.
22. Perez-Pujol S., Tonda R., Lozano M., et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 45. 6. 911–919.
23. Abonnenc M., Crettaz D., Sonego G. et al. Towards the understanding of the UV light, riboflavin and additive solution contributions to the in vitro lesions observed in Mirasol®-treated platelets. *Transfus. Clin. Biol.* 2019. 26 (4). 209–216.
24. Yuan Y., Zhao Y., Chen L., et al. Selective tumor cell death induced by irradiated riboflavin through recognizing DNA G-T mismatch. *Nucleic Acids Res.* 2017. 45. N. 15. P. 8676–8683.
25. Garg A.D., Nowis D., Golab J., et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. 1805. 53–71.
26. Akasov R.A., Sholina N.V., Khochenkov D.A., et al. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide. *Sci Rep*. 2019. 9 (1). 9679.
27. Lim L., Lim E.W.L. A Review of Corneal Collagen Cross-linking – Current Trends in Practice Applications. *Open Ophthalmol J.* 2018. 12. 181–213.
28. Mohammadpour M., Masoumi A., Mirghorbani M., et al. Updates on corneal collagen cross-linking: Indications, techniques and clinical outcomes. *J. Curr. Ophthalmol.* 2017. 29(4). 235–247.
29. Zhu Y., Reinach P.S., Zhu H. et al. High-intensity corneal collagen crosslinking with riboflavin and UVA in rat cornea. *PLoS One*. 2017. 12(6). e0179580.
30. Skaat A., Zadok D., Goldich Y., et al. Riboflavin/UVA photochemical therapy for severe infectious keratitis. *Eur. J. Ophthalmol.* 2014. 24(1). 21–28.
31. Song X., Stachon T., Wang J., et al. Viability, apoptosis, proliferation, activation, and cytokine secretion of human keratoconus keratocytes after cross-linking. *Biomed. Res. Int.* 2015. 254–237.
32. Меджитов Р., Яневич Ч. Врожденный иммунитет. *Казанский журнал*. 2004. Т. 3. С. 161–167.
33. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006. 124 (4). 783–801.
34. Janeway Jr. C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002. Vol. 20 (1). P. 197–216.
35. Romagnani S. The th1/th2 paradigm. *Immunology today*. 1997. Vol. 18 (6). P. 263–266.
36. Лабораторные тесты. Микробиологическая и вирусологическая диагностика / ред. М.Х. Турьянова, М. Каппа. Москва : Каппа, 1995. 111 с.
37. Посібник з медичної вірусології / ред. В.М. Гиріна. Київ : Здоров'я, 1995. 367 с.
38. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. 2-е изд., перераб. и доп. Киев : МОРИОН, 2001. 408 с. ISBN 966-7632-33-4

References:

1. Sousa V., Gomes A.T.P.C., Freitas A., et al. (2019) Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* in Blood Plasma and Whole Blood. *Antibiotics (Basel)*, 8(4), 221. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040221>
2. Abrahamse H., Hamblin M.R. (2016) New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.*, 473(4), 347–364. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
3. Hamblin M.R. (2016) Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol.*, 33, 67–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>
4. Conrad K.S., Bilwes A.M., Crane B.R. (2013) Light-Induced Subunit Dissociation by a Light-Oxygen-Voltage Domain Photoreceptor from Rhodobacter. *Biochemistry*, 52(2), 378–391.
5. Ruane P.H., Edrich R., Gampp D., et al. (2004) Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*, 44(6), 877–885. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03355.x>
6. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. (2003) Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*, 135, 620–627. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(02\)02220-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(02)02220-1)
7. Sheraz M.A., Kazi S.H., Ahmed S., et al. (2014) Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J. Org. Chem.*, 10, 1999–2012.
8. Khan S., Naseem I. (2017) Photocatalytic interaction of aminophylline-riboflavin leads to ROS-mediated DNA damage and cell death: a novel phototherapeutic mechanism for cancer. *IUBMB Life*, 69, 611–622.
9. Khan S., Rayis M., Rizvi A., et al. (2019) ROS mediated antibacterial activity of photoilluminated riboflavin: a photodynamic mechanism against nosocomial infections. *Toxicology reports*, 6, 136–142.
10. Maisch T., Eichner A., Späth A. et al. (2014) Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PLoS One*, 9(12), e111792.
11. Thakuri P.S., Joshi R., Basnet S., et al. (2011) Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Nepal Med. Coll. J.*, 13(4), 281–284.
12. O'Rourke J.F., Dowds B.C. (1992) Dye-mediated photodynamic inactivation of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Soc. Trans.*, 20(1), 76S.
13. Makdoui K., Goodrich R., Bäckman A. (2017) Photochemical eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by blue light activation of riboflavin. *Acta Ophthalmol.*, 95(5), 498–502.
14. Sauer A., Letscher-Bru V., Speeg-Schatz C. (2010) In vitro efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 51.8.т.3950-3953.
15. Tunccan Ö.G., Kalkancı A., Unal E.A. (2018) The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turk. J. Med. Sci.*, 48(4), 873–879.

16. Schuyler R. (2001) Use of riboflavin for photoinactivation of pathogens in blood components. *Transfus. Apher. Sci.*, 25, 189–190.
17. Zhu L., Tong H., Wang S. (2018) Effectiveness of a flow-based device using riboflavin photochemistry in damaging blood-borne viral nucleic acids. *J. Photochem. Photobiol. B*, 183, 391–396.
18. Faddy H.M., Fryk J.J., Watterson D. (2016) Riboflavin and ultraviolet light: impact on dengue virus infectivity. *Vox Sang*, 111(3), 235–241.
19. Keil S.D., Bowen R., Marschner S. (2016) Inactivation of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in plasma products using a riboflavin-based and ultraviolet light-based photochemical treatment. *Transfusion*, 56(12), 2948–2952.
20. Cap A.P., Pidcoke H.F., Keil S.D. et al. (2016) Treatment of blood with a pathogen reduction technology using ultraviolet light and riboflavin inactivates Ebola virus in vitro. *Transfusion*, 56(1), 6–15.
21. Hermida-Nogueira L., Barrachina M.N., Izquierdo I., et al. (2020) Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion. *J. Proteomics*, 210, 103529.
22. Perez-Pujol S., Tonda R., Lozano M., et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*, 45, 6, 911–919.
23. Abonnenc M., Crettaz D., Sonogo G., et al. (2019) Towards the understanding of the UV light, riboflavin and additive solution contributions to the in vitro lesions observed in Mirasol®-treated platelets. *Transfus. Clin. Biol.*, 26 (4), 209–216.
24. Yuan Y., Zhao Y., Chen L., et al. (2017) Selective tumor cell death induced by irradiated riboflavin through recognizing DNA G-T mismatch. *Nucleic Acids Res.*, 45, no. 15, pp. 8676–8683.
25. Garg A.D., Nowis D., Golab J., et al. (2010) Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1805, 53–71.
26. Akasov R.A., Sholina N.V., Khochenkov D.A., et al. (2019) Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide. *Sci Rep.*, 9 (1), 9679.
27. Lim L., Lim E.W.L. (2018) A Review of Corneal Collagen Cross-linking – Current Trends in Practice Applications. *Open Ophthalmol J.*, 12, 181–213.
28. Mohammadpour M., Masoumi A., Mirghorbani M., et al. (2017) Updates on corneal collagen cross-linking: Indications, techniques and clinical outcomes. *J. Curr. Ophthalmol.*, 29(4), 235–247.
29. Zhu Y., Reinach P.S., Zhu H. et al. (2017) High-intensity corneal collagen crosslinking with riboflavin and UVA in rat cornea. *PLoS One*, 12(6), e0179580.
30. Skaat A., Zadok D., Goldich Y., et al. (2014) Riboflavin/UVA photochemical therapy for severe infectious keratitis. *Eur. J. Ophthalmol.*, 24(1), 21–28.
31. Song X., Stachon T., Wang J., et al. (2015) Viability, apoptosis, proliferation, activation, and cytokine secretion of human keratoconus keratocytes after cross-linking. *Biomed. Res. Int.*, 254–237.

Chapter «Medical sciences»

32. Medzhitov R., Dzhanevich Ch. (2004) Innate immunity. *Kazan journal*, t. Z, pp. 161–167.
33. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124 (4), 783–801.
34. Janeway Jr. C.A., Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20 (1), 197–216.
35. Romagnani S. (1997) The th1/th2 paradigm. *Immunology today*, 18 (6), 263–266.
36. Laboratornyie testyi. Mikrobiologicheskaya i virusologicheskaya diagnostika (1995) / red. M.H. Turyanova, M. Kappa. M.: Kappa, 111 p.
37. Posibnyk z medychnoi virusolohii (1995) / red. V.M. Hyrina. Kyiv: Zdorovia, 367 p.
38. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. (2001) Statisticheskie metody i mediko-biologicheskikh issledovaniyah s ispolzovaniem Excel. 2-e izd., pererab. i dop. Kyiv: MORION, 408 p. ISBN 966-7632-33-4